



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

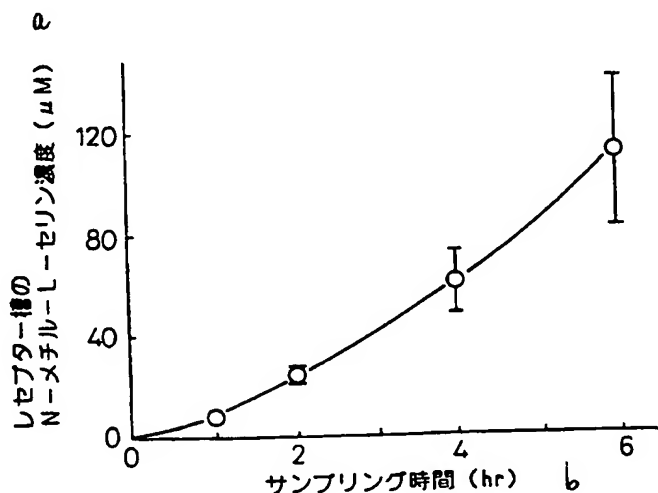
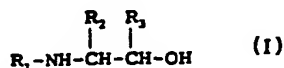
| | | |
|--|-----------|--|
| (51) 国際特許分類6 A61K 31/13, 31/195, 37/02 | A1 | (11) 国際公開番号 WO95/30412 (43) 国際公開日 1995年11月16日(16.11.95) |
| (21) 国際出願番号 (22) 国際出願日 (30) 優先権データ 特願平6/117495 1994年5月6日(06.05.94) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 鐘紡株式会社(KANEBO LIMITED)[JP/JP] 〒131 東京都墨田区墨田五丁目17番4号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 大石祐一(OISHI, Yuichi)[JP/JP] 吉田雅紀(YOSHIDA, Masaki)[JP/JP] 井上紳太郎(INOUE, Shintaro)[JP/JP] 〒250 神奈川県小田原市寿町5丁目3番28号 鐘紡株式会社 生化学研究所内 Kanagawa, (JP) (74) 代理人 弁理士 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号 静光虎ノ門ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP) | | (81) 指定国 CN, JP, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書 |

(54) Title : CYTOKINE POTENTIATOR AND REMEDY FOR DISEASES WHEREIN CYTOKINE ACTIVITY IS REDUCED

(54) 発明の名称 サイトカイン活性増強剤およびサイトカインの働きが低下した疾病の治療剤

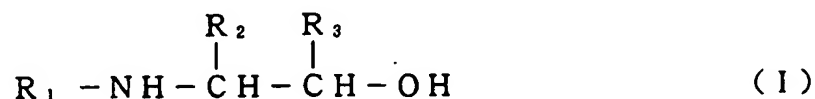
(57) Abstract

A cytokine potentiator containing an ethanolamine derivative represented by general formula (I) or a salt thereof, or a combination thereof with a cytokine or a cytokine production accelerator, and a remedy containing the potentiator as the active ingredient and applicable for diseases wherein the cytokine activity is reduced, wherein R_1 represents H, $-CH_3$, $-CH_2CH(CH_3)OH$ or $-CH_2CH_2OH$; R_2 represents H, $-CH_3$, $-CH_2CH_3$ or $-COOH$; and R_3 represents H, $-CH_3$, $-CH_2CH_3$ or $-CH_2NH_2$.



a: N-Methyl-L-serine concn. in receptor vessel (μM)
b: Sampling time (hr)

下記一般式 (I) で表されるエタノールアミン誘導体またはその塩を含有するか、またはこれとサイトカインまたはサイトカイン産生促進物質とを含有するサイトカイン活性増強剤、およびこのサイトカイン活性増強剤を有効成分として含有するサイトカインの働きが低下した疾病の治療剤。



(式中、 R_1 は H 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ または $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ であり、 R_2 は H 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ または $-\text{COOH}$ であり、 R_3 は H 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ または $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ である)

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

| | | | | | | | |
|----|-----------|----|-----------|----|----------|----|------------|
| AM | アルメニア | EE | エストニア | LK | スリランカ | RU | ロシア連邦 |
| AT | オーストリア | ES | スペイン | LR | リベリア | SD | スーダン |
| AU | オーストラリア | FI | フィンランド | LT | リトアニア | SE | スウェーデン |
| BB | バルバドス | FR | フランス | LU | ルクセンブルグ | SG | シンガポール |
| BE | ベルギー | GB | イギリス | LV | ラトヴィア | SI | スロベニア |
| BF | ブルキナ・ファソ | GE | グルジア | MC | モナコ | SK | スロバキア共和国 |
| BG | ブルガリア | GN | ギニア | MD | モルドバ | SN | セネガル |
| BJ | ベナン | GR | ギリシャ | MG | マダガスカル | SZ | スワジランド |
| BR | ブラジル | HU | ハンガリー | ML | マリ | TD | チャド |
| BY | ベラルーシ | IE | アイルランド | MN | モンゴル | TG | トーゴ |
| CA | カナダ | IS | アイスランド | MR | モロッコ | TT | トリニダード・トバゴ |
| CF | 中央アフリカ共和国 | IT | イタリア | MW | モザンビーク | TM | トルクメニスタン |
| CG | コンゴ | JP | 日本 | MX | メキシコ | TT | トリニダード・トバゴ |
| CH | スイス | KE | ケニア | NE | ニジェール | UG | ウガンダ |
| CI | コート・ジボアール | KR | 韓国 | NL | オランダ | UZ | ウズベキスタン共和国 |
| CN | 中国 | KZ | カザフスタン | NO | ノルウェー | VN | ベトナム |
| CZ | チェコ共和国 | LI | リヒテンシュタイン | NZ | ニュージーランド | | |
| DE | ドイツ | | | PL | ポーランド | | |
| DK | デンマーク | | | PT | ポルトガル | | |
| | | | | RO | ルーマニア | | |

明 細 書

サイトカイン活性増強剤およびサイトカインの働きが低下した疾病の治療剤

技術分野

本発明は、サイトカイン活性増強剤およびサイトカインの働きが低下した疾病の治療剤に関する。本発明は、特に、サイトカインの応答性を高めることによって、老化等により低下したサイトカインの反応性を賦活し、またはサイトカインの減少により起こる異常を治療できる、サイトカイン活性増強剤およびサイトカインの働きが低下した疾病の治療剤に関する。

背景技術

老化肌や荒れ肌の修復には、サイトカインの分泌が密接に関わりをもっていることが知られている。また、サイトカインは疾病にも大きく関わっていることが明らかとなり、サイトカインを治療に用いる試みが盛んに行われている。

具体的には、治療薬としてサイトカイン自体を経口または注射、経皮等の非経口でヒトに投与する方法等が挙げられる。しかし、完全治癒までの間、高価なサイトカインを大量に用いることが必要であり、治療薬として患者への経済的負担は大きい。

一方、これらのサイトカインの産生を促進する物質を用いる場合も、同様に経口または注射、経皮等の非経口でヒトに投与される。しかし、やはりこのサイトカイン産生促進物質であっても、サイトカイン使用と同様に、患者への経済的負担は大きい。

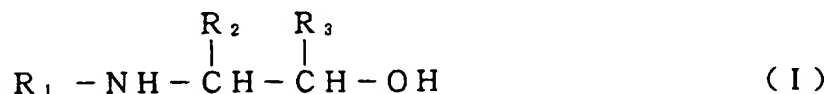
また、単独でのサイトカインの大量投与は、代謝バランスを崩す場合があり、また外用での使用には、分解や吸収性等の点で局所での効果が期待できない場合がある等の問題があり、より安全な皮膚代謝の賦活方法が望まれていた。

発明の開示

従って、本発明は、それ自体を生体に投与することによって生体中に存在するサイトカインの応答性を高めることのできるか、あるいはサイトカインを治療薬

として投与する際にその投与量を少なくすることのできる、サイトカイン活性増強剤およびサイトカインの働きが低下した疾病の治療剤を提供することを目的とする。

本発明は、上記の目的を達成するため、下記一般式（I）で表されるエタノールアミン誘導体またはその塩を含有するサイトカイン活性増強剤を提供する。



（式中、 R_1 はH、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ または $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ であり、 R_2 はH、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ または $-\text{COOH}$ であり、 R_3 はH、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ または $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ である）

本発明は、また、上記サイトカイン活性増強剤を含有する、サイトカイン活性増強剤の働きが低下した疾病の治療剤を提供する。

図面の簡単な説明

図1は、試験例－15で使用した垂直型拡散セル装置を示す図である。

図2は、試験例－15において、N－メチル－L－セリンの皮膚透過性試験を行った結果を表す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明で用いられる上記一般式（I）で表されるエタノールアミン誘導体は、 R_1 がHである場合、 R_2 はH、 $-\text{CH}_3$ または $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ であるのが好ましく、このとき R_3 はH、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ または $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ であるのがよい。 R_1 が $-\text{CH}_3$ である場合、 R_2 は $-\text{COOH}$ であるのが好ましく、このとき R_3 はH、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ または $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ であるのがよい。さらに、 R_1 が $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ または $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ である場合、 R_2 はHであるのが好ましく、このとき R_3 はH、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ または $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ であるのがよい。

一般式（I）で表されるエタノールアミン誘導体の具体例としては、N－メチル－L－セリン、ジエタノールアミン、エタノールアミン、N－メチルエタノール

ルアミン、N-イソプロパノイル-2-メチル-エタノールアミン、D, L-2-アミノ-1-プロパノール、2-アミノ-1-ブタノール、1, 3-ジアミノ-2-プロパノール、1-アミノ-2-ブタノール等を挙げることができる。

また、一般式(1)で表されるエタノールアミン誘導体の塩としては、特に限定されないが、特に薬学的に許容される塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩および酢酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩等の有機酸塩を挙げることができる。

本発明で用いられるサイトカインとしては、血小板由来成長因子(Platelet-Derived Growth Factor、以下PDGFと略記する)、線維芽細胞成長因子(Fibroblast Growth Factor、以下FGFと略記する)、上皮成長因子(Epidermal Growth Factor、以下EGFと略記する)、形質転換成長因子(Transferring Growth Factor、以下TGFと略記する)、骨形成因子(Bone Morphogenetic Protein、以下BMPと略記する)、インターフェロン(Interferon、以下IFNと略記する)、顆粒球コロニー刺激因子(Granulocyte Colony-Stimulating Factor、以下G-CSFと略記する)、マクロファージコロニー刺激因子(Macrophage Colony-Stimulating Factor、以下M-CSFと略記する)、インシュリン様成長因子(Insulin-Like Growth Factor、以下IGFと略記する)、肝細胞成長因子(Hepatocyte Growth Factor、以下HGFと略記する)、骨髄幹細胞成長因子(Stem Cell Factor、以下SCFと略記する)、神経成長因子(Nerve Growth Factor、以下NGFと略記する)、血管内皮成長因子(Vascular Endothelial Cell Growth Factor、以下VEGFと略記する)、インターロイキン(インターロイキン・ネットワーク、講談社、1992年)等が挙げられる。それらのうちでも、特に、レセプターのサブユニットにチロシンキナーゼ、セリンもしくはスレオニンリン酸化またはキナーゼ活性を有するサイトカインに高い効果が見られるので好ましい。

レセプターのサブユニットにチロシンキナーゼ、セリンもしくはスレオニンリン酸化またはキナーゼ活性を有するサイトカインとしては、上記サイトカインのうち、EGF, IGF, KGF, FGF, PDGF, M-CSF, SCF, VEGF, NGF, HGF, IL-2, TGFなどが挙げられる。

塩基性FGF (basic FGF、以下bFGFと略記する) やEGF (現代化学増刊16、東京化学同人社、131頁)、PDGF (現代化学増刊4、東京化学同人社、114頁、1985年) またはEGFレセプターに結合するTGFアルファ (TGF α 、サイトカイン、メジカルビュー社、10頁、1991年)、酸性FGF (acidic FGF、Molecular Medicine、30巻、986頁、1993年) は、脳卒中や、褥創、創傷、潰瘍の治療薬として、抗胃潰瘍剤として、また心筋梗塞の改善に用いられている例もある。

一方、BMPは、今後高齢化社会を迎えるにあたって増加する骨粗鬆症の治療薬として期待されている (実験医学10巻、15号、2010頁、1992年)。

また、TGFベータ1 (以下、TGF- β 1と略す) は、骨折治癒剤の他、プロゼラチナーゼA以外のマトリックス・メタロプロテアーゼ産生抑制、またティッシュ・インヒビター・オブ・メタロプロテイナーゼス (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases、以下TIMPと略記する) の産生を促進する (実験医学、10巻、15号、1860頁、1992年) ので、リウマチ治療薬として、さらにI型コラーゲン合成を促進することから、創傷治癒剤として期待されている。

肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor、以下HGFと略記する) は、最近行われている臓器移植の際の臓器再生剤として、また腫瘍細胞の増殖抑制をする (FEBS Letters、2巻、229頁、1991年) ことから、日本人の死亡率1位である癌の治療薬としても期待されている。

IFNガンマ (IFN γ) およびG-CSFは、免疫系を増強することから、腫瘍治療薬として使用されている。

インターロイキン-2 (IL-2) は、悪性血管細胞種の治療薬として報告例があるほか、LAK療法に使用されている。LAK療法は、体外で患者のリンパ

球をIL-2を添加して培養し、細胞障害性T細胞（CTL）およびナチュラルキラー細胞（NK細胞）の数を増加させて体内に戻し、免疫増強により癌を治療する免疫賦活癌治療法の1種である（岩波新書出版「がんの治療」、小林博著、292、151頁～154頁、1993年）。

IL-2と類似の作用があり、それより強い活性を持つものとして、インターロイキン-12（IL-12）がある（実験医学、10巻、3号、395頁～399頁、1992年）。このサイトカインについても、抗癌剤やLAK療法等への応用が検討されている（日経バイオテク、277号、2頁～3頁、1993年）。

本発明で用いられるサイトカイン産生促進物質としては、例えば、溶連菌 Streptococcus pyogenes をペニシリンで殺した製剤（OK-432）、グリチルリチン酸、グリチルレチン酸などが挙げられる。OK-432は、腫瘍治療剤として使用されており、腹腔内投与したマウスの脾臓細胞においてIFNを産生することが確認されている。また、グリチルリチン酸は、肝炎治療剤として使用されている他、IFN産生作用を有する。

本発明において、サイトカインの働きが低下した疾病とは、サイトカインの量が低下したか、あるいはサイトカイン自体の反応性（応答性）が低下した疾病を意味する。

具体的には、褥創、胃潰瘍等の潰瘍、肺繊維症、肝硬変などの臓器繊維症、骨粗鬆症、さらにはガン等の免疫系が低下した疾病等が挙げられる。

本発明のサイトカイン活性増強剤およびサイトカインの働きが低下した疾病の治療剤は、その使用目的に応じて、通常用いられる公知の成分を配合することによって、固形剤、半固形剤、液剤等の各種剤形の組成物に調製することが可能である。具体的には、固形剤としては、錠剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、粉末剤、硬カプセル剤等が挙げられ、半固形剤としては、軟膏、ゲル、クリーム等が挙げられ、液剤としては、シロップ剤、エリキシル剤、軟カプセル剤、ローション、スプレー剤、貼付剤等が挙げられる。

通常用いられる公知の成分としては、例えば、ワセリン、スクワラン、流動パラフィン等の炭化水素、ステアリルアルコール、セタノール等の高級アルコール

、ミリスチン酸イソプロピル、パルミチン酸イソプロピル等の高級脂肪酸の低級アルキルエステル、ラノリン等の動物性油脂、グリセリン、プロピレングリコール等の多価アルコール、マクロゴール400、マクロゴール4000等のポリエチレングリコール、モノステアリン酸グリセリン等のグリセリン脂肪酸エステル、ラウリル硫酸ナトリウム、モノステアリン酸ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸（商品名NICKOL DDP-2、日本サーファクタント工業株式会社）などの界面活性剤、蠟、樹脂、水および要すればパラオキシ安息香酸ブチル、パラオキシ安息香酸メチル等の防腐剤とを混合し、常法により製造することができる。

これらの組成物は、一剤形であってもよいが、一般式（I）で表されるエタノールアミン誘導体またはその塩と、サイトカインまたはサイトカイン産生促進物質を分けて2剤形とすることもできる。2剤形とした場合は、使用時に併用すればよい。その際、2剤形の投与経路は異なってもよい。

一般式（I）で表されるエタノールアミン誘導体の含有量は、剤形により異なるが、適用する組成物全量を基準として、好ましくは0.0001～2重量%、さらに好ましくは0.001～1重量%である。ただし、入浴剤のように使用時に希釈されるものはさらに含有量を増やすことができる。

また、前記LAK療法において、体外で培養するリンパ球にサイトカインを添加培養する場合に、本発明の一般式（I）で表されるエタノールアミン誘導体を含有するサイトカイン活性増強剤を培地中に添加して、補助剤として使用することもできる。この場合の添加量は、一般式（I）で表されるエタノールアミン誘導体量として、培地全量を基準として、好ましくは0.0001～2重量%、さらに好ましくは0.001～0.5重量%である。

本発明のサイトカイン活性増強剤およびサイトカインの働きが低下した疾病の治療剤は、研究・試験用試薬として培養細胞系に添加して用いることができるほか、通常の医薬品および化粧品の有効成分として用いることもできる。

本発明のサイトカイン治療剤は、前記LAK療法において培養リンパ球系に添加して用いるほか、経口投与、注射、経皮投与等の方法で用いることができる。

経口投与する際の剤形としては、錠剤、顆粒剤、散剤、細粒剤、硬カプセル剤

等の固形剤のほか、シロップ剤、エリキシル剤、軟カプセル剤等の液剤が含まれる。

錠剤、顆粒剤、散剤および細粒剤は、一般式（I）の化合物またはその薬学的に許容される塩と、例えば、乳糖、でんぷん、結晶セルロース、ステアリン酸マグネシウム、ヒドロキシプロピルセルロース、タルク等の通常の医薬添加物とを混合して製造される。

硬カプセル剤は、上記の細粒剤や散剤を適宜カプセルに充填して製造される。

シロップ剤は、白糖、D-ソルビトール、カルボキシメチルセルロース等を含む水溶液に、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸プロピル等の防腐剤とともに一般式（I）の化合物またはその薬学的に許容される塩を溶解または懸濁して製造される。

エリキシル剤は、一般式（I）の化合物またはその薬学的に許容される塩のエタノール溶液に、グリセリン、オレンジ油、レモン油、コリアンダー油、アニス油、タルク等を混合して製造される。

軟カプセル剤は、脂質賦形剤、例えば、植物油、油性エマルジョン、グリコール類等に、一般式（I）の化合物またはその薬学的に許容される塩を溶解または懸濁し、軟カプセルに充填して製造される。

注射剤は、一般式（I）の化合物またはその薬学的に許容される塩を生理食塩水または、例えば、植物油、油性エマルジョン、グリコール等の脂質賦形剤に溶解または乳化させ、無菌的にアンプルまたはバイアルに封入することによって製造される。バイアルを用いる場合には、封入する際に、サイトカインまたはサイトカイン産生を促進する薬剤を同時に添加後、凍結乾燥して製造することも可能である。

経皮投与する際の剤形としては、軟膏剤、ゲル剤、クリーム等の半固形剤、ローション剤、パップ剤、スプレー剤および貼付剤等の液剤等が含まれる。

本発明のサイトカイン治療剤は、経口または非経口で投与される。例えば、臓器腫瘍、心臓病等の臓器の疾病には経口、経皮または注射により、乾癬、ケロイド等の上皮の疾病には経皮または局所注射により、本発明のサイトカイン活性増強剤を投与するのが好ましい。

投与量は、患者の年齢、体重、症状、投与方法または共に投与するサイトカインまたはサイトカイン産生促進物質の量により異なるが、成人に投与する場合、一般には、1回当たり化合物（I）として0.5～1000mgの量を、1日1～3回投与する。そして、例えば、臓器腫瘍、心臓病等の臓器の疾病に対して経口または注射により全身投与する場合には1回当たり30～1000mgの投与量が適当であり、臓器の疾病、乾癬、ケロイド等の上皮の疾病に対して経皮により局所投与する場合には1回当たり1～50mgの投与量が適当である。これらの場合、共に使用するサイトカインまたはサイトカイン産生促進物質の治療薬としての量は通常より20～90%減らして使用できる。

次に、実施例に先立ち、本発明の効果を示す試験例を記載する。ただし、本発明は、試験例中に記された原料および配合比に限定されるものではない。なお、各試験例中に用いる語句の定義を下記に記載する。

（a）MEM培地

Minimum Essential Medium（大日本製薬社製、10-101）10.6gに1.2g炭酸水素ナトリウムを添加し、蒸留水を加えて1lとした後、炭酸ガスを吹き込んでpHを約7にした（以下、MEM培地と略記する）。

（b）FBS

牛胎仔血清（Fetal Bovine Serum）

（c）測定用緩衝液

0.2M塩化ナトリウム、5mM塩化カルシウムおよび0.05%（W/V）ブリッジ-35（商標、ナカライテスク（株）製、ポリオキシエチレン（23E.O.）ラウリルエーテル）を含有する50mMトリス水溶液を塩酸にて室温でpH7.5に調整した緩衝液。

（d）コラゲナーゼ

コラゲナーゼとしては、ヒト線維肉腫細胞由来の足場非依存性細胞に、無血清無タンパク質培地中で産生させたヒトプロコラゲナーゼをCM-セファロース（商標、ファルマシア社製）および亜鉛キレーティングセファロース（商標、ファルマシア社製）により精製して測定用緩衝液に溶解し、これに活性化剤としてト

リブシン（シグマ社製、Type 12）を添加して、35℃にて5分間インキュベートした後、ダイズトリプシンインヒビター（メルク社製）を添加してトリプシンを失活させたものを用いた（特願平1-238941号公報参照）。

（e）プロコラゲナーゼ産生量

本試験では、プロコラゲナーゼ産生量は、トリプシンで活性化して得られるコラゲナーゼ活性として定量した。

（f）TIMP産生量

本試験では、TIMP産生量は、コラゲナーゼの阻害活性として定量した。

（g）bFGF応答性増強率

本試験では、bFGFがプロコラゲナーゼ産生量を促進することが知られているので、化合物のbFGF活性増強率は、プロコラゲナーゼ産生量を精製水添加と比較して算出した。

（h）TGF- β 1応答性増強率

本試験では、TGF- β 1がTIMP産生量を促進することが知られているので、化合物のTGF- β 1活性増強率は、TIMP産生量を精製水添加と比較して算出した。

（i）PDGF応答性増強率

本試験では、PDGFがプロコラゲナーゼ産生量を促進することが知られているので、化合物のPDGF活性増強率は、プロコラゲナーゼ産生量を精製水添加と比較して算出した。

（j）動物実験におけるbFGF応答性増強率

本試験では、bFGFが血管新生を促進することが知られているので、化合物のbFGF活性増強率は、ラット腹部皮下に注入したマトリジェル中のヘモグロビン量を無添加と比較して産出した。

試験例-1

正常ヒト線維芽細胞株〔白人女性の皮膚より採取されたCCD45SK（ATCC CRL 1506）〕の細胞密度を10%（V/V）FBSおよび1%（V/V）非必須アミノ酸（大日本製薬社製）を含むMEM培地にて 1×10^5 個/mlに調製し、12穴プレートにそれぞれ0.8mlずつ播種（ 8×10^4 個

／穴)して、5%炭酸ガス、飽和水蒸気下、37℃で培養した。

後述する実施例1に記載のサイトカイン活性増強剤(N-メチル-L-セリン)を0.6%(V/V)FBSを添加したMEM培地で希釈して1mMとし、添加溶液とした。

24時間後培養液を吸引除去し、終濃度0.6%(V/V)FBSを添加したMEM培地で細胞を2回洗浄した後、添加溶液0.8mlを加え、2日間培養した。

2日後、培養液を吸引除去し、添加溶液0.8mlを加え、2日間培養した。この操作をさらにもう一度繰り返し、サイトカイン活性増強剤を含む培地で細胞を計6日間処理した。

上記操作の終了後、培養液を吸引除去し、3ng/mlbFGF(ベーリンガー・マンハイム社製)および0.6%(V/V)FBSを含むMEM培地を0.8ml添加し、3日間培養して培養上清を得た。

得られた培養上清500 μ lに10mMトリス塩酸緩衝液[4℃でpH7.8に調整、1mM塩化カルシウム、0.05%(W/V)ブリッジ-35を含む]を3.5ml加え、同緩衝液で平衡化したCM-セファロースCL-6B(商標、ファルマシア社製、ベッド容量0.5ml)に供した。

次に、125mM塩化ナトリウムを含む上記と同じ緩衝液0.5mlにてインヒビターを除去(計4回、総量2ml)し、500mM塩化ナトリウムを含む同緩衝液0.5mlにてプロコラゲナーゼを回収(計4回、総量2ml)し、試験液とした。

試験液を測定用緩衝液で適宜希釈後、25 μ lを測定用緩衝液25 μ lと混合してトリプシン溶液(シグマ社、Type12を測定用緩衝液にて濃度1mg/mlに調整)20 μ lを添加し、35℃にて5分間インキュベートした後、ダイズトリプシンインヒビター溶液(測定用緩衝液にて濃度3mg/mlに調整)30 μ lを添加してトリプシンを失活させ、コラゲナーゼ溶液を得た。

フルオレッセンイソチオシアネート(以下、FITCと略記する)で標識されたI型コラーゲン(濃度1mg/mlのFITC-コラーゲン酢酸溶液、コスモバイオ社製)を基質溶液として用い、永井等の方法(炎症、4巻、2号、123

頁、1984年参照)に準じて上記コラゲナーゼの活性(単位/ml)を測定した。そして、上記のトリプシン処理によりプロコラゲナーゼから生じるコラゲナーゼが、35℃にて1分間当り1 μ gのI型コラーゲン(FITC-コラーゲン)を分解する量をプロコラゲナーゼの1単位とし、プロコラゲナーゼ産生量(単位/培養液ml)を求めた(この値をX₁とする)。

一方、比較例1として、N-メチル-L-セリンの代わりに精製水を加え、上記と同様の操作によりサイトカイン活性増強剤(N-メチル-L-セリン)を添加しない場合のプロコラゲナーゼ産生量(単位/培養液ml)を求めた(この値をY₁とする)。

次いで、これらの値から下式によりサイトカイン(bFGF)活性増強率を算出した。結果を下記表1に示す。

$$\text{bFGF 活性増強率 (\%)} = \{X_1 / Y_1\} \times 100$$

表1

| サイトカイン 活性増強剤 | プロコラゲナーゼ産生量 (単位/ml) | bFGF 活性 増強率 (%) |
|----------------------------|------------------------|--------------------|
| 比較例1 (精製水) | 6.8 \pm 1.6 | 100 |
| 実施例1 (1mM N- メチル-L-セリン) | 15 \pm 1.0 | 220 |
| 平均値 \pm 標準偏差 (n = 3) | | |

実施例1のサイトカイン活性増強剤は、プロコラゲナーゼ産生量を増加させており、サイトカイン(bFGF)活性を増強していた。

試験例-2 (濃度依存性)

後述する実施例1に記載のサイトカイン活性増強剤(N-メチル-L-セリン)を0.6%(V/V)FBSを添加したMEM培地で希釈して0.01~10mMとし、添加溶液とした。

試験例-1と同様にして培養後、培養上清を得た。

得られた培養上清中のプロコラゲナーゼ産生量を定量した。結果を下記表2に示す。

表 2

| サイトカイン 活性増強剤 (N-メチル- L-セリン) 濃度 (mM) | プロコラゲナーゼ産生量 (単位/m l) | b F G F 活性 増強率 (%) |
|---|-------------------------|-----------------------|
| 比較例 (0 mM) | 1 5 ± 2. 0 | 1 0 0 |
| 0. 0 1 | 1 5 ± 3. 3 | 1 0 0 |
| 0. 1 | 1 7 ± 2. 9 | 1 1 0 |
| 0. 3 | 2 4 ± 3. 5 | 1 6 0 |
| 1. 0 | 1 9 ± 1. 3 | 1 3 0 |
| 3. 0 | 2 6 ± 1. 5 | 1 7 0 |
| 1 0 | 3 2 ± 2. 2 | 2 1 0 |
| 平均値 ± 標準偏差 (n = 3) | | |

N-メチル-L-セリンは、プロコラゲナーゼ産生量を増加させており、サイトカイン (b F G F) 活性を濃度依存的に増強していた。

試験例 - 3

試験例 - 1 と同様に、正常ヒト線維芽細胞株を播種した。

後述する実施例 2 に記載のサイトカイン活性増強剤 (ジェタノールアミン) を 0. 6 % (V/V) F B S を添加した M E M 培地で 1 m M に希釈して添加溶液とした。

試験例 - 1 と同様にして培養後、培養上清を得た。ただし、ここでは、b F G F の添加量を 1 0 n g / m l とした。測定の結果を下記表 3 に示す。

表 3

| サイトカイン 活性増強剤 | プロコラゲナーゼ産生量 (単位/m l) | b F G F 活性 増強率 (%) |
|----------------------------|-------------------------|-----------------------|
| 比較例 1 (精製水) | 7. 3 ± 0. 3 | 1 0 0 |
| 実施例 2 (1 m M ジェタノールアミン) | 1 4 ± 1. 3 | 1 9 0 |
| 平均値 ± 標準偏差 (n = 3) | | |

実施例 2 のサイトカイン活性増強剤は、プロコラゲナーゼ産生量を増加させており、サイトカイン (b F G F) 活性を増強していた。

試験例 - 4

正常ヒト線維芽細胞株 [白人女性の皮膚より採取された D e t r o i t - 5 5 1 (A T C C C C L 1 1 0)] の細胞密度を 1 0 % (V/V) F B S、終濃

度 0.1% (W/V) ラクトアルブミン酵素水解物 (シグマ社製)、1% (V/V) 非必須アミノ酸および 1 mM ピルビン酸ナトリウム (以上いずれも大日本製薬社製) を含む MEM 培地にて 1×10^5 個/ml に調整し、12 穴プレートにそれぞれ 0.8 ml ずつ播種 (8×10^4 個/穴) して、5% 炭酸ガス、飽和水蒸気下、37℃ で培養した。

後述する実施例 3 に記載のサイトカイン活性増強剤 (エタノールアミン) を 0.6% (V/V) FBS、終濃度 0.1% (W/V) ラクトアルブミン酵素水解物、1% (V/V) 非必須アミノ酸および 1 mM ピルビン酸ナトリウムを添加した MEM 培地で希釈して 1 mM とし、添加溶液とした。

24 時間後培養液を吸引除去し、終濃度 0.6% (V/V) FBS を添加した MEM 培地で細胞を 2 回洗浄した後、添加溶液 0.8 ml を加え、4 日間培養した。

4 日後、培養液を吸引除去し、3 ng/ml bFGF、0.6% (V/V) FBS、終濃度 0.1% (W/V) ラクトアルブミン酵素水解物、1% (V/V) 非必須アミノ酸および 1 mM ピルビン酸ナトリウムを含む MEM 培地を 0.8 ml 添加し、3 日間培養して培養上清を得た。

得られた培養上清 250 μ l に 10 mM トリス塩酸緩衝液 [4℃ で pH 7.8 に調整、1 mM 塩化カルシウム、0.05% (W/V) ブリッジ-35 を含む] を 1.5 ml 加え、同緩衝液で平衡化した CM-セファロース CL-6B (商標、ベッド容量 0.5 ml) に供した。

CM-セファロース CL-6B (商標) からのプロコラゲナーゼの回収およびプロコラゲナーゼ量の測定を、試験例-1 と同様に行なった。結果を下記表 4 に示す。

表 4

| サイトカイン 活性増強剤 | プロコラゲナーゼ産生量 (単位/ml) | bFGF 活性 増強率 (%) |
|--------------------------|------------------------|--------------------|
| 比較例 1 (精製水) | 12 ± 1.7 | 100 |
| 実施例 3 (1 mM エタノールアミン) | 21 ± 1.3 | 180 |
| 平均値 ± 標準偏差 (n = 3) | | |

実施例 3 のサイトカイン活性増強剤は、プロコラゲナーゼ産生量を増加させており、サイトカイン (b F G F) 活性を増強していた。

試験例 - 5

後述する実施例 4 に記載のサイトカイン活性増強剤 (N-メチルエタノールアミン) について、試験例 - 4 と同様にして b F G F 活性増強を調べた。測定の結果を下記表 5 に示す。

表 5

| サイトカイン 活性増強剤 | プロコラゲナーゼ産生量 (単位/ml) | b F G F 活性 増強率 (%) |
|--------------------------------|------------------------|-----------------------|
| 比較例 1 (精製水) | 6.8 ± 0.7 | 100 |
| 実施例 4 (1 mM N- メチルエタノールアミン) | 12 ± 1.7 | 180 |
| 平均値 ± 標準偏差 (n = 3) | | |

実施例 4 のサイトカイン活性増強剤は、プロコラゲナーゼ産生量を増加させており、サイトカイン (b F G F) 活性を増強していた。

試験例 - 6

正常ヒト線維芽細胞株 [白人女性の皮膚より採取された D e t r o i t - 5 5 1 (A T C C C C L 110)] の細胞密度を 10% (V/V) F B S、終濃度 1% (V/V) 非必須アミノ酸および 1 mM ピルビン酸ナトリウム (以上いずれも大日本製薬社製) を含む MEM 培地 (以下、MEM 2 培地と呼ぶ) にて 1×10^5 個/ml に調整し、12 穴プレートにそれぞれ 0.8 ml ずつ播種 (8×10^4 個/穴) して、5% 炭酸ガス、飽和水蒸気下、37℃で培養した。

後述する実施例 5 に記載のサイトカイン活性増強剤 (N-イソプロパイル-2-メチル-エタノールアミン) を 0.6% (V/V) F B S を含む MEM 2 培地で希釈して 3 mM とし、添加溶液とした。

24 時間後培養液を吸引除去し、終濃度 0.6% (V/V) F B S を添加した MEM 2 培地で細胞を 2 回洗浄した後、添加溶液 0.8 ml を加え、2 日間培養した。

2 日後、培養液を吸引除去し、再度添加溶液 0.8 ml を加えて 2 日間培養し、計 4 日間培養した。

2日後、培養液を吸引除去し、 3 ng/ml bFGF、 0.6% (V/V) FBSを含むMEM2培地を 0.8 ml 添加し、3日間培養して培養上清を得た。

CM-セファロースCL-6B (商標) からのプロコラゲナーゼの回収およびプロコラゲナーゼの測定を、試験例-1と同様にして行った。

得られた培養上清中のプロコラゲナーゼ産生量を定量した。結果を下記表6に示す。

表6

| サイトカイン 活性増強剤 | プロコラゲナーゼ産生量 (単位/ml) | bFGF活性 増強率 (%) |
|---------------------------------------|------------------------|-------------------|
| 比較例1 (精製水) | 8.6 ± 2.3 | 100 |
| 実施例5 (3 mM N-イソプロパノイル-2-メチル-エタノールアミン) | 6.5 ± 1.3 | 760 |
| 平均値±標準偏差 (n = 3) | | |

N-イソプロパノイル-2-メチル-エタノールアミンは、プロコラゲナーゼ産生量を増加させており、サイトカイン (bFGF) 活性を増強していた。

試験例-7

試験例-6と同様に、正常ヒト線維芽細胞株を播種した。

後述する実施例6に記載のサイトカイン活性増強剤 (D, L-2-アミノ-1-プロパノール) を 0.6% (V/V) FBSを含むMEM2培地で希釈して3 mMとし、添加溶液とした。

試験例-6と同様にして培養後、培養上清を得た。

得られた培養上清中のプロコラゲナーゼ産生量を定量した。結果を下記表7に示す。

表7

| サイトカイン 活性増強剤 | プロコラゲナーゼ産生量 (単位/ml) | bFGF活性 増強率 (%) |
|---------------------------------|------------------------|-------------------|
| 比較例1 (精製水) | 8.6 ± 2.3 | 100 |
| 実施例6 (3 mM D, L-2-アミノ-1-プロパノール) | 3.3 ± 4.7 | 380 |
| 平均値±標準偏差 (n = 3) | | |

D, L-2-アミノ-1-プロパノールは、プロコラゲナーゼ産生量を増加させており、サイトカイン (b F G F) 活性を増強していた。

試験例-8

試験例-6と同様に、正常ヒト線維芽細胞株を播種した。

後述する実施例7に記載のサイトカイン活性増強剤 (2-アミノ-1-ブタノール) を0.6% (V/V) FBSを含むMEM2培地で希釈して3mMとし、添加溶液とした。

試験例-6と同様にして培養後、培養上清を得た。

得られた培養上清中のプロコラゲナーゼ産生量を定量した。結果を下記表8に示す。

表 8

| サイトカイン 活性増強剤 | プロコラゲナーゼ産生量 (単位/ml) | b F G F 活性 増強率 (%) |
|------------------------------|------------------------|-----------------------|
| 比較例1 (精製水) | 12 ± 2.2 | 100 |
| 実施例7 (3mM 2- アミノ-1-ブタノール) | 22 ± 2.4 | 190 |
| 平均値±標準偏差 (n = 3) | | |

2-アミノ-1-ブタノールは、プロコラゲナーゼ産生量を増加させており、サイトカイン (b F G F) 活性を増強していた。

試験例-9

試験例-6と同様に、正常ヒト線維芽細胞株を播種した。

後述する実施例8に記載のサイトカイン活性増強剤 (1, 3-ジアミノ-2-プロパノール) を0.6% (V/V) FBSを含むMEM2培地で希釈して3mMとし、添加溶液とした。

試験例-6と同様にして培養後、培養上清を得た。

得られた培養上清中のプロコラゲナーゼ産生量を定量した。結果を下記表9に示す。

表 9

| サイトカイン 活性増強剤 | プロコラゲナーゼ産生量 (単位/m l) | b F G F 活性 増強率 (%) |
|--|-------------------------|-----------------------|
| 比較例 1 (精製水) | 1 2 ± 2 . 2 | 1 0 0 |
| 実施例 8 (3 mM 1, 3 - ジアミノ - 2 - プロパノール) | 1 8 ± 0 . 9 5 | 1 5 0 |
| 平均値 ± 標準偏差 (n = 3) | | |

1, 3 - ジアミノ - 2 - プロパノールは、プロコラゲナーゼ産生量を増加させており、サイトカイン (b F G F) 活性を増強していた。

試験例 - 1 0

試験例 - 6 と同様に、正常ヒト線維芽細胞株を播種した。

後述する実施例 9 に記載のサイトカイン活性増強剤 (1 - アミノ - 2 - ブタノール) を 0 . 6 % (V / V) F B S を含む M E M 2 培地で希釈して 3 m M とし、添加溶液とした。

試験例 - 6 と同様にして培養後、培養上清を得た。

得られた培養上清中のプロコラゲナーゼ産生量を定量した。結果を下記表 1 0 に示す。

表 1 0

| サイトカイン 活性増強剤 | プロコラゲナーゼ産生量 (単位/m l) | b F G F 活性 増強率 (%) |
|-------------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| 比較例 1 (精製水) | 8 . 2 ± 2 . 0 | 1 0 0 |
| 実施例 9 (3 mM 1 - アミノ - 2 - ブタノール) | 2 4 ± 2 . 3 | 2 9 0 |
| 平均値 ± 標準偏差 (n = 3) | | |

1 - アミノ - 2 - ブタノールは、プロコラゲナーゼ産生量を増加させており、サイトカイン (b F G F) 活性を増強していた。

試験例 - 1 1

後述する実施例 1 に記載のサイトカイン活性増強剤 (N - メチル - L - セリン) を 0 . 6 % (V / V) F B S を添加した M E M 培地で希釈して 1 m M とし、添加溶液とした。

試験例－１と同様にして添加溶液で６日間培養した。６日後、 30 ng/ml PDGF-BB（オーストラル・バイオロジカルズ社製）および 0.6% （V/V）FBSを含むMEM培地を 0.8 ml 添加し、３日間培養して培養上清を得た。

サイトカイン（PDGF）活性増強率を、試験例－１と同様に、サイトカイン活性増強剤を添加した培養上清中のプロコラゲナーゼ産生量を X_2 とし、比較例１として精製水を添加した培養上清中のプロコラゲナーゼ産生量を Y_2 として下式により算出した。

$$\text{サイトカイン（PDGF）活性増強率（\%）} = \left[X_2 / Y_2 \right] \times 100$$

得られた培養上清中のプロコラゲナーゼ産生量を定量した。結果を下記表１１に示す。

表 1 1

| サイトカイン 活性増強剤 | プロコラゲナーゼ産生量 (単位/ml) | PDGF 活性 増強率 (%) |
|------------------------------|------------------------|--------------------|
| 比較例 1 (精製水) | 0.61 ± 0.10 | 100 |
| 実施例 1 (1 mM N- メチル-L-セリン) | 4.2 ± 2.0 | 690 |
| 平均値±標準偏差 (n = 3) | | |

実施例 1 のサイトカイン活性増強剤は、プロコラゲナーゼ産生量を増加させており、サイトカイン（PDGF）活性を増強していた。

試験例－１２

後述する実施例 1 に記載のサイトカイン活性増強剤（N-メチル-L-セリン）を 0.6% （V/V）FBSを添加したMEM培地で希釈して 1 mM とし、添加溶液とした。

試験例－１と同様に添加溶液を添加して６日間培養した。培養後、培地を除去し、 3 ng/ml TGF- $\beta 1$ （オーストラル・バイオロジカルズ社製）および 0.6% （V/V）FBSを含むMEM培地を 0.8 ml 添加し、３日間培養して培養上清を得た。

得られた培養上清中のTIMP産生量の測定を、以下のようにして行った。

まず、培養上清を測定用緩衝液にて $10 \sim 1000$ 倍に希釈する。各希釈液と

既知量（0.24単位）のコラゲナーゼ溶液とを等量混合し、FITC-コラーゲンを基質として、試験例-1と同様にコラゲナーゼ活性を測定する。この測定結果から阻害曲線を求め、この阻害曲線から50%阻害する培養上清の希釈倍率を求め、この希釈倍率を単位とした。

一方、比較例1として、試験例-1と同様の操作を行った。また、サイトカイン（TGF- β 1）活性増強率は、サイトカイン活性増強剤を添加した培養上清中のTIMP産生量を X_3 とし、比較例1として精製水を添加した培養上清中のTIMP産生量を Y_3 として下式により算出した。

$$\text{サイトカイン（TGF-}\beta\text{1）活性増強率（\%）} = [X_3 / Y_3] \times 100$$

得られた培養上清中のTIMP産生量を定量した。結果を下記表12に示す。

表 1 2

| サイトカイン 活性増強剤 | TIMP産生量 (単位/ml) | TGF- β 1 増強率(%) |
|---------------------------|--------------------|--------------------------|
| 比較例1(精製水) | 99 ± 9.0 | 100 |
| 実施例1(1mM N- メチル-L-セリン) | 240 ± 21 | 240 |
| 平均値±標準偏差 (n=3) | | |

実施例1のサイトカイン活性増強剤は、TIMP産生量を増加させており、サイトカイン（TGF- β 1）活性を増強していた。

試験例-13

後述する実施例3に記載のサイトカイン活性増強剤（エタノールアミン）を0.6%FBSを含むMEM培地で1mMに希釈して添加溶液とし、試験例-12と同様に培養上清を得た。ただし、サイトカイン活性増強剤添加での培養期間を4日間とし、またTGF- β 1添加6日後の培養上清のTIMP産生量を測定した。

得られた培養上清のTIMP産生量を定量した。結果を下記表13に示す。

表 1 3

| サイトカイン 活性増強剤 | T I M P 産生量 (単位 / m l) | T G F - β 1 増強率 (%) |
|--------------------------|---------------------------|------------------------------|
| 比較例 1 (精製水) | 1 6 0 \pm 3 . 0 | 1 0 0 |
| 実施例 3 (1 mM エタノールアミン) | 2 5 0 \pm 9 . 0 | 1 6 0 |
| 平均値 \pm 標準偏差 (n = 3) | | |

実施例 3 のサイトカイン活性増強剤は、T I M P 産生量を増加させており、サイトカイン (T G F - β 1) 活性を増強していた。

試験例 - 1 4

実施例 1 0 [8 4 m M (1 重量 %) N - メチル - L - セリン] または実施例 1 1 [7 5 m M (1 重量 %) N - イソプロパノイル - 2 - メチル - エタノールアミン] のクリームを、腹部毛剃した S D 系雄性ラット (7 週齢、体重 2 1 0 ~ 2 3 0 g 、 1 群 1 8 ~ 2 4 匹、日本クレア社より入手) に 2 1 日間にわたり毎日塗布後、1 n g / m l b F G F (大日本製薬社製) およびヘパリン (G i b c o B R L 社製) を含むマトリジェル [M A T R I G E L (商標) 、基底膜マトリックス・フェノールレッドフリー、カタログナンバー 4 0 2 3 4 C] を腹部皮下に 1 m l ずつ注入し、8 日後に腹部から採取した。

採取したマトリジェルをリン酸緩衝液 (生理食塩水含) 中でヒスコトロン (商標、日音医理科器械製作所 (株)) にてホモゲナイズ後、遠心し、上清中のヘモグロビン量をヘモグロビン - テストワコー (和光純薬社製) を用いて測定した (この値を X₄ とする。) 。

一方、後述する比較例 2 のクリームを用い、上記と同様の操作を行った後、サイトカイン活性増強剤 (N - メチル - L - セリン) を添加しない場合のヘモグロビン量を測定した (この値を Y₄ とする。) 。

表 1 4

| 成 分 | 比較例 2 |
|------------------|----------|
| ステアリン酸 | 8. 0 |
| セタノール | 2. 0 |
| 親油型モノステアリン酸グリセリン | 2. 0 |
| ラノリン | 2. 0 |
| 流動パラフィン | 6. 0 |
| メチルポリシロキサン | 0. 1 |
| パラオキシ安息香酸ブチル | 0. 0 4 |
| 水酸化カリウム | 0. 3 4 |
| 濃グリセリン | 6. 0 |
| 1, 3-ブチレングリコール | 7. 0 |
| セチル硫酸ナトリウム | 0. 1 |
| パラオキシ安息香酸メチル | 0. 0 4 |
| 精製水 | 6 6. 3 8 |
| 表中の数値は g を表す。 | |

次いで、これらの値から下式によりサイトカイン（b F G F）活性増強率を算出した。

$$\text{b F G F 活性増強率 (\%)} = [X_4 / Y_4] \times 100$$

得られたマトリジェル中のヘモグロビン量を定量した。結果を下記表 1 5 に示す。

表 1 5

| サイトカイン 活性増強剤 | ヘモグロビン量 (mg) | b F G F 活性 増強率 (%) |
|--|-----------------|-----------------------|
| 比較例 2 (無添加) | 2 1 5 ± 2 2 | 1 0 0 |
| 実施例 1 0 (8 4 mM N-メチル-L-セリン) | 2 6 2 ± 4 2 | 1 2 2 |
| 実施例 1 1 (7 5 mM N-イソプロパノイル-2-メチル-エタノールアミン) | 2 4 5 ± 2 9 | 1 1 4 |
| 平均値±標準誤差 (比較例 ; n = 2 4、実施例 1 0 ~ 1 1 ; n = 1 8) | | |

N-メチル-L-セリンおよびN-イソプロパノイル-2-メチル-エタノールアミンは、それぞれヘモグロビン量を増加させており、サイトカイン（b F G F）活性を増強していた。

試験例-1 5 (皮膚透過性試験)

試験前日に剃毛したWistar系雄性ラットをエーテルで屠殺後、すみやかに腹部皮膚を剥離した。

後述する応用例－２８～３０のクリームを試料とし、図１に示す垂直型拡散セル装置（ケルコソ・エンジニアリング社製、有効面積 8 cm^2 ）を用いた。図１において、１はテトラフルオロエチレン製ふた部、２はサンプリング口、３は薬物試料、４は皮膚、５はＯ－リング、６はレセプター相、７は攪拌子である。

上記の垂直型拡散セル装置を用い、セルを 32°C の空気恒温槽中に置き、レセプター側には等張リン酸緩衝液（１．４４％炭酸水素ナトリウムと２．３３％リン酸二水素カリウムで調製）４５ｍｌを入れ、ドナー側のラット腹部剥離皮膚に試料１ｇを塗布し（ $n=3$ ）、１、２、４および６時間後にレセプター槽の緩衝液を０．２ｍｌずつ採取し、直ちに -20°C で冷凍保存した。

凍結試料を融解後、１０ｍＭ塩酸で適当な濃度に希釈し、アスパラチルグリシン（終濃度 $40 \mu\text{M}$ ）を内部標準として加えた。外部標準にはアミノ酸分析標準液（ＡＮ型）に、同濃度のアスパラチルグリシンおよびＮ－メチル－Ｌ－セリン、エタノールアミンおよびＮ－メチルエタノールアミン（終濃度 $10 \mu\text{M}$ ）を添加して用いた。これらの検体の定量を、ｏ－フタルアルデヒド法を用いたポストカラム・アミノ酸分析法（リチウム法）（Analytical Biochemistry、９６巻、２９８頁、１９７９年）により行った。

Ｎ－メチル－Ｌ－セリンに対する結果を図２に示す。Ｎ－メチル－Ｌ－セリン（応用例２８）はラット皮膚を透過し、クリーム塗布後２～６時間の透過速度は約 $0.12 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{時間}$ であった（図２）。また、エタノールアミン（応用例２９）およびＮ－メチルエタノールアミン（応用例３０）も皮膚を透過することが分かった（表１６）。

表 １ ６

| 応用例 | レセプター槽中のエタノールアミンまたはモノメチルエタノールアミン濃度 ($\mu\text{mol}/\text{ml}$) | |
|-----|--|--------|
| | ２時間後 | ６時間後 |
| ２ ９ | ０． １ ５ | ０． ６ ３ |
| ３ ０ | ０． １ ８ | ０． ６ ９ |

試験例－１６（急性毒性試験）

水、およびＮ－メチル－Ｌ－セリンの水溶液（検体として $5 \text{ g}/\text{kg}$ 体重とな

るように調製)を0.2 ml/kg体重の割合でICR系雄性マウス(5週齢、体重24~28 g、一群5匹)に経口投与し、その後7日間マウスを観察した。

N-メチル-L-セリン投与群には、対照群(水だけを投与)と同様に、全く死亡例は認められなかった。

試験例-17(皮膚累積刺激試験)

N-メチル-L-セリン、エタノールアミンおよびN-メチルエタノールアミンを、それぞれ、塩酸にてpH7に調整した水溶液を試験試料とした。

日本在来種雄性家兎(体重約3 kg)を用い、ドレイツ法(Appraisal of the Safety of Chemicals in Foods, Drugs and Cosmetics、46頁、1959年、edited and published by the Deitorial Committee, Association of Food and Drug Officials of U. S. A.)に準じて試験した。

すなわち、毛を刈り取った家兎背部(3×4 cm)に、試験化合物の0.1%(W/V)水溶液0.1 mlを開放適用にて1日1回ずつ4日間塗布した。24時間後、塗布の紅斑、浮腫、痂皮および亀裂スコアを付けた。

表17

| 評価基準 | 紅斑スコア | 浮腫スコア | 痂皮スコア | 亀裂スコア |
|--|-------|-------|-------|-------|
| A | 0 | 0 | 0 | 0 |
| B | 1 | 1 | 1 | 1 |
| C | 2 | 2 | 2 | 2 |
| D | 3 | 3 | 3 | 3 |
| A: 紅斑なし、浮腫なし、痂皮なしおよび亀裂なし B: 軽度の紅斑、浮腫、痂皮または亀裂 C: 中程度の紅斑、浮腫、痂皮または亀裂 D: 強度の紅斑、浮腫、痂皮または亀裂 | | | | |

表17に挙げた紅斑スコア、浮腫スコア、痂皮スコアおよび亀裂スコアを合計して累積刺激スコアとした。

次に、この累積刺激スコアより、下記表18の基準に基づき、N-メチル-L-セリン、エタノールアミンおよびN-メチルエタノールアミンの刺激度を判定した。結果を下記表19に示す。

表 1 8

軽度刺激：累積刺激スコア 0～2 未満
 中程度刺激：累積刺激スコア 2～6 未満
 強度刺激：累積刺激スコア 6 以上

表 1 9

| 試験化合物 | 累積刺激スコア | 刺激度 |
|---------------|---------|-----|
| N-メチル-L-セリン | 0 | 軽 度 |
| エタノールアミン | 0 | 軽 度 |
| N-メチルエタノールアミン | 0 | 軽 度 |

N-メチル-L-セリン、エタノールアミンおよびN-メチルエタノールアミンの皮膚に対する累積刺激性は低いことが認められた。

試験例-18（皮膚一次刺激試験、特開平04-1130号公報参照）

N-メチル-L-セリン、エタノールアミンおよびN-メチルエタノールアミンを、それぞれ、塩酸にてpH7に調整した水溶液を試験試料とした。

日本在来種雄性家兎（体重約3kg）を用い、前述のドレイツ法に準じて試験した。

すなわち、毛を刈り取った家兎背部に擦傷部位（損傷皮膚）を作成し、損傷皮膚と正常皮膚のそれぞれに、水0.1ml、または試験化合物の1%（W/V）水溶液0.1mlを、パッチテスト用絆創膏（1.2x1.6cm、リボンエイド登録商標、リバーテープ製薬製）に浸潤させて貼付した。24時間後、絆創膏を剝離し、皮膚の紅斑および浮腫状態を観察し、さらに絆創膏剝離の48時間後にも同様に観察した。そして、表20の評価基準にてそれぞれ紅斑および浮腫スコアを付けた。

表 2 0

| 評価基準 | 紅斑スコア | 浮腫スコア |
|-------------|-------|-------|
| 紅斑なしおよび浮腫なし | 0 | 0 |
| 極軽度の紅斑または浮腫 | 1 | 1 |
| 軽度の紅斑または浮腫 | 2 | 2 |
| 中程度の紅斑または浮腫 | 3 | 3 |
| 強度の紅斑または浮腫 | 4 | 4 |

表 2 1 に挙げた各スコアを求め、下記式により一次刺激スコアを計算した。

$$\text{一次刺激スコア} = \frac{A+B}{2} + \frac{C+D}{2} + \frac{E+F}{2} + \frac{G+H}{2}$$

表 2 1

| | |
|-----|-------------------------------|
| A : | 正常皮膚に絆創膏を貼付してから、24 時間後の紅斑スコア |
| B : | 正常皮膚から絆創膏を剥離してから、48 時間後の紅斑スコア |
| C : | 正常皮膚に絆創膏を貼付してから、24 時間後の浮腫スコア |
| D : | 正常皮膚から絆創膏を剥離してから、48 時間後の浮腫スコア |
| E : | 損傷皮膚に絆創膏を貼付してから、24 時間後の紅斑スコア |
| F : | 損傷皮膚から絆創膏を剥離してから、48 時間後の紅斑スコア |
| G : | 損傷皮膚に絆創膏を貼付してから、24 時間後の浮腫スコア |
| H : | 損傷皮膚から絆創膏を剥離してから、48 時間後の浮腫スコア |

次に、一次刺激スコアより下記表 2 2 の基準に基づき、N-メチル-L-セリンの刺激度を判定した。結果を下記表 2 3 に示す。

表 2 2

| | |
|-------|--------------------|
| 軽度刺激 | : 一次刺激スコア 0 ~ 2 未満 |
| 中程度刺激 | : 一次刺激スコア 2 ~ 5 未満 |
| 強度刺激 | : 一次刺激スコア 5 以上 |

表 2 3

| 試験化合物 | 一次刺激スコア | 刺激度 |
|---------------|---------|-----|
| N-メチル-L-セリン | 0 | 軽度 |
| エタノールアミン | 0 | 軽度 |
| N-メチルエタノールアミン | 0.25 | 軽度 |

N-メチル-L-セリン、エタノールアミンおよびN-メチルエタノールアミンの皮膚刺激性は低いことが認められた（特開平4-1130号公報参照）。

試験例-19（皮膚刺激性試験）

N-メチル-L-セリン、エタノールアミンおよびN-メチルエタノールアミンを、それぞれ、塩酸にてpH7に調整した水溶液を試験試料とした。また、健康人19名を被検者とした。

クローズドパッチテスト法（Journal of the Society of Cosmetic Chemist、31巻、97頁、1980年）により、被検者の前腕部にKIチャンバーを用いて、試験化合物の1%（W/V）

水溶液 0.05 ml を 24 時間閉塞貼付し、パッチ除去 1 時間後および 24 時間後の皮膚反応を観察した。

N-メチル-L-セリン、エタノールアミンおよびN-メチルエタノールアミンのいずれのパッチテストにおいても、パッチ除去 1 時間後および 24 時間後の両時点で 1 名の被検者に軽微な紅斑が認められただけで、皮膚刺激性はほとんどないと判断された。

以下に、本発明の実施例を挙げて、さらに説明する。

実施例 1 (N-メチル-L-セリン)

1 M の N-メチル-L-セリン水溶液をポアサイズが 0.2 μ m のニトロセルロース膜 (アドヴァンテック東洋社製、DISMIC-25) で濾過滅菌し、サイトカイン活性増強剤を得た。

実施例 2 ~ 4 (ジエタノールアミン、エタノールアミンおよびN-メチルエタノールアミン)

塩酸で pH 7.5 に調整したジエタノールアミン、エタノールアミンまたは N-メチルエタノールアミン 1 M 溶液を用い、氷冷下にて行う以外は、実施例 1 と同様にして、サイトカイン活性増強剤を得た。

実施例 5 ~ 9 (N-イソプロパノイル-2-メチル-エタノールアミン、D, L-2-アミノ-1-プロパノール、2-アミノ-1-ブタノール、1, 3-ジアミノ-2-プロパノールおよび 1-アミノ-2-ブタノール)

氷冷下に、N-イソプロパノイル-2-メチル-エタノールアミン、D, L-2-アミノ-1-プロパノール、2-アミノ-1-ブタノール、1, 3-ジアミノ-2-プロパノールおよび 1-アミノ-2-ブタノールを、それぞれ、pH 7.5 に塩酸で調整して 1 M 溶液とし、ポアサイズが 0.2 μ m のニトロセルロース膜 (アドヴァンテック東洋社製、DISMIC-25) で濾過滅菌し、サイトカイン活性増強剤を得た。

実施例 10 ~ 11 (クリーム)

100 g 中に有効成分として N-メチル-L-セリン (実施例 1) または N-イソプロパノイル-2-メチル-エタノールアミン (実施例 5) 1000 mg を含有するクリームを表 24 の通りに調製した。

表 2 4

| 成 分 | 実 施 例 | |
|--|-------|-------|
| | 1 0 | 1 1 |
| 実施例 1 (N-メチル-L-セリン) のサイトカイン活性増強剤 | 9.4 | 0 |
| 実施例 5 (N-イソプロパノイル-2-メチル-エタノールアミン) のサイトカイン活性剤 | 0 | 7.5 |
| ステアリン酸 | 8.0 | 8.0 |
| セタノール | 2.0 | 2.0 |
| 親油型モノステアリン酸グリセリン | 2.0 | 2.0 |
| ラノリン | 2.0 | 2.0 |
| 流動パラフィン | 6.0 | 6.0 |
| メチルポリシロキサン | 0.1 | 0.1 |
| パラオキシ安息香酸ブチル | 0.04 | 0.04 |
| 水酸化カリウム | 0.34 | 0 |
| 濃グリセリン | 6.0 | 6.0 |
| 1, 3-ブチレングリコール | 7.0 | 7.0 |
| セチル硫酸ナトリウム | 0.1 | 0.1 |
| パラオキシ安息香酸メチル | 0.04 | 0.04 |
| 塩酸 | 0 | 0.4 |
| 精製水 | 56.98 | 58.82 |
| 表中の数値は g を表す。 | | |

N-メチル-L-セリンまたはN-イソプロパノイル-2-メチル-エタノールアミンと、パラオキシ安息香酸メチル、水酸化カリウム、濃グリセリン、1, 3-ブチレングリコール、セチル硫酸ナトリウムおよび精製水とを湯浴で 80℃ に加温して混合し、この混合物を、80℃ に加温したステアリン酸、セタノール、親油型モノステアリン酸グリセリン、ラノリン、流動パラフィン、メチルポリシロキサンおよびパラオキシ安息香酸ブチルの混合物中に攪拌しながら徐々に加えた。次に、ホモジナイザー (TOKUSHUKI KAIKOGYO 製) で 2.5 分間激しく攪拌し (2500 rpm)、各成分を十分乳化分散させた後、攪拌しながら徐々に冷却してクリームを得た。

比較例 2

N-メチル-L-セリンまたはN-イソプロパノイル-2-メチル-エタノールアミンを加えず、精製水を 66.38 g とする以外は、実施例 10～11 と同様にして、比較例 2 のクリームを得た。

実施例 12～14 (錠剤)

表 2 5 の成分 (A) の混合物に、成分 (B) を 3 0 g の水に溶解して加え、十分練合した。この練合物を 2 0 メッシュの篩に通して顆粒状に造粒し、乾燥した後、得られた顆粒に成分 (C) を混合し、1 錠 2 0 0 m g に打錠することによって、1 錠中に有効成分を 1 0 0 m g 含有する錠剤を調製した。

表 2 5

| 成 分 | | 実 施 例 | | |
|---------------|----------------|-------|-----|-----|
| | | 1 2 | 1 3 | 1 4 |
| A | N-メチル-L-セリン | 5 0 | 0 | 0 |
| | ジェタノールアミン塩酸塩 | 0 | 5 0 | 0 |
| | エタノールアミン塩酸塩 | 0 | 0 | 5 0 |
| | 乳糖 | 1 0 | 1 0 | 1 0 |
| | トウモロコシデンプン | 3 0 | 3 0 | 3 0 |
| | 結晶セルロース | 8 | 8 | 8 |
| B | ヒドロキシプロピルセルロース | 1 | 1 | 1 |
| C | ステアリン酸マグネシウム | 1 | 1 | 1 |
| 表中の数値は g を表す。 | | | | |

実施例 1 5 ~ 2 0 (カプセル剤)

表 2 6 の各成分を充分混合し、混合物の 3 0 0 m g ずつを 2 号カプセルに充填して、1 カプセル中に有効成分を 1 0 0 m g (実施例 1 5 ~ 1 7) または 2 0 0 m g (実施例 1 8 ~ 2 0) 含有するカプセル剤を調製した。

表 2 6

| 成 分 | 実 施 例 | | | | | |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 5 | 1 6 | 1 7 | 1 8 | 1 9 | 2 0 |
| N-メチル-L-セリン | 1 0 0 | 0 | 0 | 2 0 0 | 0 | 0 |
| ジェタノールアミン塩酸塩 | 0 | 1 0 0 | 0 | 0 | 2 0 0 | 0 |
| エタノールアミン塩酸塩 | 0 | 0 | 1 0 0 | 0 | 0 | 2 0 0 |
| 乳糖 | 1 0 0 | 1 0 0 | 1 0 0 | 2 0 | 2 0 | 2 0 |
| トウモロコシデンプン | 5 0 | 5 0 | 5 0 | 3 0 | 3 0 | 3 0 |
| 結晶セルロース | 4 7 | 4 7 | 4 7 | 4 7 | 4 7 | 4 7 |
| ステアリン 酸マグネシウム | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 表中の数値は g を表す。 | | | | | | |

実施例 2 1 ~ 2 6 (顆粒剤)

表 2 7 の成分 (A) の混合物に、水 1 0 0 0 g に溶解した成分 (B) を加え、

十分練合した。この練合物を 20 メッシュの篩に通して造粒し、乾燥し、整粒を行うことによって、1 g 中に有効成分を 30 mg（実施例 21～23）または 300 mg（実施例 24～26）含有する顆粒剤を調製した。

表 27

| 成 分 | | 実 施 例 | | | | | |
|---------------|----------------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 |
| A | N-メチル-L-セリン | 30 | 0 | 0 | 300 | 0 | 0 |
| | ジエタノールアミン塩酸塩 | 0 | 30 | 0 | 0 | 300 | 0 |
| | エタノールアミン塩酸塩 | 0 | 0 | 30 | 0 | 0 | 300 |
| | 乳糖 | 470 | 470 | 470 | 470 | 470 | 470 |
| | トウモロコシデンプン | 470 | 470 | 470 | 200 | 200 | 200 |
| B | ヒドロキシプロピルセルロース | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |
| 表中の数値は g を表す。 | | | | | | | |

実施例 27～29（シロップ剤）

精製水 400 ml に 90℃ で表 28 中の成分（B）を加えて溶解し、次いで成分（C）を同温に加え、十分混合してから 30℃ まで冷却した。この混合物に成分（A）を精製水 100 ml に溶解して加え、30℃ で 30 分間攪拌した。次に、成分（D）を加え、20 分間攪拌し、精製水を加えて全量 1000 ml とし、無菌濾過を行うことによって、1 ml 中に有効成分を 100 mg 含有するシロップ剤を調製した。

表 2 8

| 成 分 | | 実施例 | | |
|----------------------------|--|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | 2 7 | 2 8 | 2 9 |
| A | N-メチル-L-セリン ジエタノールアミン塩酸塩 エタノールアミン塩酸塩 | 100 0 0 | 0 100 0 | 0 0 100 |
| B | パラオキシ安息香酸メチル パラオキシ安息香酸プロピル 白糖 | 0.3 0.15 300 | 0.3 0.15 300 | 0.3 0.15 300 |
| C | 70% (W/V) D-ソルビトール水溶液 | 250 | 250 | 250 |
| D | クエン酸ナトリウム クエン酸 | 10 1.5 | 10 1.5 | 10 1.5 |
| 精製水を加えて全量 1 0 0 0 m l とする。 | | | | |
| 表中の数値は g を表す。 | | | | |

実施例 3 0 ～ 5 3 (注射剤)

下記の表 2 9 に示す量のサイトカイン活性増強剤を、注射用精製水 (1 0 % ヒト血清アルブミンおよび 2 0 % マンニトールを含む) に溶解して 2 0 0 m l の溶液とし、無菌濾過による除菌を行った。N-メチル-L-セリン、エタノールアミンおよびジエタノールアミンの場合は、除菌した溶液 1 0 m l 容量のバイアル瓶に 2 m l ずつ分注した。無菌的に窒素置換し、打栓し、注射剤を得た。N-メチルエタノールアミン、N-イソプロパノイル-2-メチル-エタノールアミン、D, L-2-アミノ-1-プロパノール、2-アミノ-1-ブタノール、1, 3-ジアミノ-2-プロパノールおよび 1-アミノ-2-ブタノールの場合は、除菌した溶液を 3 m l 容量の褐色アンプルに 2 m l ずつ分注し、アンプルを溶封して注射剤を得た。尚、表中の有効成分量は、1 バイアル中または 1 アンプル中の N-メチル-L-セリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、N-メチルエタノールアミン、N-イソプロパノイル-2-メチル-エタノールアミン、D, L-2-アミノ-1-プロパノール、2-アミノ-1-ブタノール、1, 3-ジアミノ-2-プロパノールまたは 1-アミノ-2-ブタノールとしての量を表す。

表 2 9

| | | サイトカイン活性増強剤 | 配合量 | 有効成分量 |
|-----|-----|-------------------------------|------------------------|-----------|
| 実施例 | 3 0 | N-メチル-L-セリン | 1 0 g | 1 0 0 m g |
| | 3 1 | N-メチル-L-セリン TGF- β 1 | 1 0 g 1 m g | 1 0 0 m g |
| | 3 2 | ジェタノールアミン塩酸塩 | 4 0 g | 4 0 0 m g |
| | 3 3 | ジェタノールアミン TGF- β 1 | 4 0 g 1 0 μ g | 4 0 0 m g |
| | 3 4 | エタノールアミン塩酸塩 | 2 0 g | 2 0 0 m g |
| | 3 5 | エタノールアミン TGF- β 1 | 2 0 g 1 0 0 μ g | 2 0 0 m g |
| | 3 6 | N-メチルエタノール | 1 0 g | 1 0 0 m g |
| | 3 7 | アミン | 2 0 g | 2 0 0 m g |
| | 3 8 | | 4 0 g | 4 0 0 m g |
| | 3 9 | N-イソプロパノイル | 1 0 g | 1 0 0 m g |
| | 4 0 | -2-メチル-エタノールアミン | 2 0 g | 2 0 0 m g |
| | 4 1 | | 4 0 g | 4 0 0 m g |
| | 4 2 | D, L-2-アミノ | 1 0 g | 1 0 0 m g |
| | 4 3 | -1-プロパノール | 2 0 g | 2 0 0 m g |
| | 4 4 | | 4 0 g | 4 0 0 m g |
| | 4 5 | 2-アミノ-1- | 1 0 g | 1 0 0 m g |
| | 4 6 | ブタノール | 2 0 g | 2 0 0 m g |
| | 4 7 | | 4 0 g | 4 0 0 m g |
| | 4 8 | 1, 3-ジアミノ-2 | 1 0 g | 1 0 0 m g |
| | 4 9 | -プロパノール | 2 0 g | 2 0 0 m g |
| | 5 0 | | 4 0 g | 4 0 0 m g |
| | 5 1 | 1-アミノ-2- | 1 0 g | 1 0 0 m g |
| | 5 2 | ブタノール | 2 0 g | 2 0 0 m g |
| | 5 3 | | 4 0 g | 4 0 0 m g |

実施例 5 4 ~ 7 1 (軟膏剤)

表 3 0 および 3 1 中の成分 (A) を湯浴で 8 0 °C に加温して混合し、この混合物を、8 0 °C に加温した成分 (B) 中に攪拌しながら徐々に加えた。次に、ホモジナイザー (TOKUSHUKIKAKOGYO 製) で 2. 5 分間激しく攪拌し (2 5 0 0 r p m)、各成分を十分乳化分散させた後、攪拌しながら徐々に冷却し、最後にエタノールアミン誘導体と b F G F または a F G F とを添加することによって、1 0 0 g 中に有効成分 5 0 0 m g と b F G F 2 m g とを (実施例 5 4

～62)、または有効成分1000mgとaFGF0.2mgとを(実施例63～71)含有する軟膏を調製した。

以下に、応用例を示す。表中の数値は、特記しない限り、重量％を表す。

応用例 1～27

100g中に有効成分としてN-メチル-L-セリン（応用例1、10および19）、ジエタノールアミン（応用例2、11および20）、エタノールアミン（応用例3、12および21）、N-メチルエタノールアミン（応用例4、13および22）、N-イソプロパノイル-2-メチル-エタノールアミン（応用例5、14および23）またはD, L-2-アミノ-1-プロパノール（応用例6、15および24）、2-アミノ-1-ブタノール（応用例7、16および25）、1, 3-ジアミノ-2-プロパノール（応用例8、17および26）または1-アミノ-2-ブタノール（応用例9、18および27）を100、200または400mg含有するローションを表32および33の通りに調製した。

表 3 2

| 成 分 | 応 用 例 | | | | | | | | | | | | | |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 1 0 | 1 1 | 1 2 | 1 3 | 1 4 |
| 実施例 1 N-オクトール-1-セリン | 0.94 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.88 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 実施例 2 ジタノール-1-セリン | 0 | 1.05 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.10 | 0 | 0 | 0 |
| 実施例 3 イタノール-1-セリン | 0 | 0 | 1.74 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.48 | 0 | 0 |
| 実施例 4 N-オクトール-1-セリン | 0 | 0 | 0 | 1.43 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.87 | 0 |
| 実施例 5 N-イソオクトール-2-オクトール-1-セリン | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.75 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.50 |
| 実施例 6 D,L-2-アミノ-1-アミノ-1-セリン | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 実施例 7 2-アミノ-1-アミノ-1-セリン | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 実施例 8 1,3-ジ-アミノ-2-アミノ-1-セリン | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.21 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 実施例 9 1-アミノ-2-アミノ-1-セリン | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| A ラウリン酸ナトリウム 精製水 | 0.5 91.96 | 0.5 91.85 | 0.5 91.16 | 0.5 91.47 | 0.5 92.15 | 0.5 91.60 | 0.5 91.68 | 0.5 91.69 | 0.5 91.68 | 0.5 91.02 | 0.5 90.80 | 0.5 89.42 | 0.5 90.03 | 0.5 91.40 |
| B サラシミツロウ セタノール ¹⁾ 濃グリセリン | 0.1 1.5 5.0 | 0.1 1.5 5.0 | 0.1 1.5 5.0 | 0.1 1.5 5.0 | 0.1 1.5 5.0 | 0.1 1.5 5.0 | 0.1 1.5 5.0 | 0.1 1.5 5.0 | 0.1 1.5 5.0 | 0.1 1.5 5.0 | 0.1 1.5 5.0 | 0.1 1.5 5.0 | 0.1 1.5 5.0 | 0.1 1.5 5.0 |

1) 商品名ピナソールNAA 48、日本油脂株式会社製

表中の数値は g を表す。

表 3 3

| 成 分 | 応 用 例 | | | | | | | | | | | | |
|---|------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 |
| 有 効 成 分 | 実施例 1 N-メチル-L-セリン | 0 | 0 | 0 | 3.76 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 実施例 2 ジエタノールミン | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.21 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 実施例 3 イタノールミン | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6.96 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 実施例 4 N-メチル-イタノールミン | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5.73 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 実施例 5 N-イソプロピル-2-メチル-イ ノールミン | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.00 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 実施例 6 D,L-2-アミノ-1-プロピノール | 2.70 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5.30 | 0 | 0 | 0 |
| | 実施例 7 2-アミノ-1-イタノール | 0 | 2.44 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.66 | 0 | 0 |
| | 実施例 8 1,3-ジアミノ-2-プロピノール | 0 | 0 | 2.42 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.63 | 0 |
| | 実施例 9 1-アミノ-2-イタノール | 0 | 0 | 0 | 2.44 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.66 |
| A ラウリン酸ナトリウム 精製水 | 0.5 90.20 | 0.5 90.46 | 0.5 90.48 | 0.5 90.46 | 0.5 89.14 | 0.5 88.69 | 0.5 85.94 | 0.5 87.17 | 0.5 89.90 | 0.5 87.60 | 0.5 89.24 | 0.5 89.27 | 0.5 89.24 |
| B サラシミツロウ セタノール ¹⁾ 濃グリセリン | 0.1 1.5 5.0 | 0.1 1.5 5.0 | 0.1 1.5 5.0 | 0.1 1.5 5.0 | 0.1 1.5 5.0 | 0.1 1.5 5.0 | 0.1 1.5 5.0 | 0.1 1.5 5.0 | 0.1 1.5 5.0 | 0.1 1.5 5.0 | 0.1 1.5 5.0 | 0.1 1.5 5.0 | 0.1 1.5 5.0 |

1) 商品名ピナノールNAA 48、日本油脂株式会社製

表中の数値はgを表す。

表中の有効成分と、成分（Ａ）を湯浴で８０℃に加温して混合した。一方、成分（Ｂ）も同様に８０℃に加温して混合し、この混合物へ前者の混合物を攪拌しながら徐々に加え、ホモジナイザー（ＴＯＫＵＳＨＵＫＩＫＡＩＫＯＧＹＯ製）で２．５分間激しく攪拌した（２５００ｒｐｍ）。攪拌しながら徐々に室温まで冷却してローションを得た。

応用例 ２８～３０

表３４に示す組成でクリームを調製した。

表 ３ ４

| 成 分 | | 応 用 例 | | |
|---------------|--------------------------------|-------|------|------|
| | | ２ ８ | ２ ９ | ３ ０ |
| Ａ | セタノール | ３ | ３ | ３ |
| | 親油型モノステアリン酸グリセリン | ２.５ | ２.５ | ２.５ |
| | ポリオキシエチレンセチルエーテル (２０Ｅ．Ｏ．) | １.５ | １.５ | １.５ |
| | 流動パラフィン | １０ | １０ | １０ |
| | トリ－２－エチルヘキサン酸グリセリン | ５ | ５ | ５ |
| | メチルポリシロキサン | １ | １ | １ |
| Ｂ | パラオキシ安息香酸ブチルエステル | ０.１ | ０.１ | ０.１ |
| Ｃ | パラオキシ安息香酸メチルエステル エデト酸二ナトリウム | ０.１５ | ０.１５ | ０.１５ |
| | | ０.１ | ０.１ | ０.１ |
| Ｄ | Ｎ－ステアロイル－Ｌ－グルタミン酸 ナトリウム | ０.９ | ０.９ | ０.９ |
| | ジプロピレングリコール | ５ | ５ | ５ |
| | Ｎ－メチル－Ｌ－セリン | ２ | ０ | ０ |
| | エタノールアミン | ０ | ２ | ０ |
| | Ｎ－メチルエタノールアミン | ０ | ０ | ２ |
| | 水 | 残量 | 残量 | 残量 |
| 合 計 | | １００ | １００ | １００ |
| 表中の数値は重量％を示す。 | | | | |

成分（Ａ）を８０℃で均一に混合溶解した後、それに成分（Ｂ）を混合溶解した（混合液Ⅰ）。これとは別に、成分（Ｄ）を８０℃で均一に混合溶解後、それに成分（Ｃ）を混合溶解した（混合液Ⅱ）。次に、混合液Ⅰに、徐々に混合液Ⅱを加え、十分攪拌しながら３０℃まで冷却し、クリームを得た。

応用例 3 1 (ヘアートニック)

表 3 5

| | |
|--|--------|
| サリチル酸 | 0. 1 |
| ジエタノールアミン | 0. 0 1 |
| プロピレングリコール | 3. 0 |
| グリチルレチン酸 | 0. 0 1 |
| 1-メントール | 0. 1 |
| エタノール | 5 0. 0 |
| ヒトPDGF (Collaborative Res. Inc. 社製 : 0. 0 1 %水溶液) | 0. 0 5 |
| 香料 | 適量 |
| 精製水 | 残量 |
| 1 0 0 重量% | |

応用例 3 2 (ヘアートニック)

表 3 6

| | |
|-------------|----------|
| N-メチル-L-セリン | 0. 1 |
| エタノールアミン | 0. 0 0 1 |
| エタノール | 4. 0 |
| イソプロパノール | 1. 0 |
| 香料、防腐剤 | 適量 |
| 精製水 | 残量 |
| 1 0 0 重量% | |

応用例 3 3 (エアゾルタイプの皮膜剤)

表 3 7

| | |
|--|----------|
| エチルセルロース | 7. 5 |
| N-メチル-L-セリン | 0. 2 |
| グリセリン | 1. 0 |
| ハッカ油 | 0. 3 |
| エタノール | 3 0. 9 8 |
| ヒトPDGF (Collaborative Res. Inc. 社製 : 0. 0 1 %水溶液) | 0. 0 2 |
| 噴射剤 (ジメチルエーテル) | 6 0. 0 |
| 1 0 0 重量% | |

応用例 3 4 (入浴剤)

N-メチル-L-セリン 3 g と下記成分とを混合し、入浴剤 1 0 0 g を得た。

表 3 8

| | 重量 (g) |
|------------------------|----------|
| 香料 | 0. 1 |
| 有機色素 | 0. 0 1 |
| 炭酸水素ナトリウム | 1 4. 9 |
| 硫酸ナトリウム | 8 1. 6 9 |
| アスコルビン酸硫酸エステル 2 ナトリウム塩 | 0. 3 |

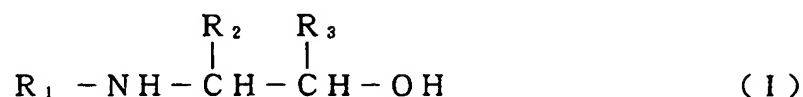
尚、この入浴剤は使用時に約 3 0 0 0 倍に希釈される。

産業上の利用可能性

本発明のサイトカイン活性増強剤は、皮膚細胞に作用して、サイトカインに対する応答性を高め、皮膚代謝を賦活することができる。また、一般式 (I) で表されるエタノールアミン誘導体またはその塩は、皮膚を透過しうるので、局所的にサイトカインの作用を増強することができる。さらに、エタノールアミン誘導体またはその塩は、毒性は低く、全身投与においてもサイトカインの作用を増強することができる。従って、一般式 (I) のエタノールアミン誘導体およびその塩は、サイトカイン活性増強剤として有用である。

請 求 の 範 囲

1. 下記一般式 (I) で表されるエタノールアミン誘導体またはその塩を含有するサイトカイン活性増強剤。



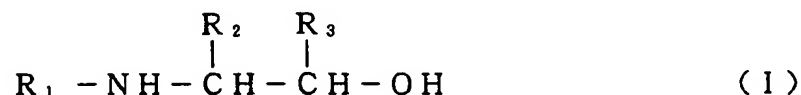
(式中、 R_1 はH、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH(CH_3)OH$ または $-CH_2CH_2OH$ であり、 R_2 はH、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ または $-COOH$ であり、 R_3 はH、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ または $-CH_2NH_2$ である)

2. 一般式 (I) において、 R_1 がHであり、 R_2 がH、 $-CH_3$ または $-CH_2CH_3$ であり、 R_3 がH、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ または $-CH_2NH_2$ である、請求項1記載のサイトカイン活性増強剤。

3. 一般式 (I) において、 R_1 が $-CH_3$ であり、 R_2 が $-COOH$ であり、 R_3 がH、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ または $-CH_2NH_2$ である、請求項1記載のサイトカイン活性増強剤。

4. 一般式 (I) において、 R_1 が $-CH_3$ 、 $-CH_2CH(CH_3)OH$ または $-CH_2CH_2OH$ であり、 R_2 がHであり、 R_3 がH、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ または $-CH_2NH_2$ である、請求項1記載のサイトカイン活性増強剤。

5. 下記一般式 (I) で表されるエタノールアミン誘導体またはその塩と、サイトカインまたはサイトカイン産生促進物質とを含有するサイトカイン活性増強剤。



(式中、 R_1 はH、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH(CH_3)OH$ または $-CH_2CH_2OH$ であり、 R_2 はH、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ または $-COOH$ であり、 R_3 はH、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ または $-CH_2NH_2$ である)

6. 一般式 (I) で表されるエタノールアミン誘導体が、N-メチル-L-セリン、ジエタノールアミン、エタノールアミン、N-メチルエタノールアミン、

N-イソプロパノイル-2-メチル-エタノールアミン、D, L-2-アミノ-1-プロパノール、2-アミノ-1-ブタノール、1, 3-ジアミノ-2-プロパノールおよび1-アミノ-2-ブタノールからなる群から選ばれる、請求項1～5のいずれかに記載のサイトカイン活性増強剤。

7. 請求項1～6のいずれかに記載のサイトカイン活性増強剤を有効成分として含有する、サイトカインの働きが低下した疾病の治療剤。

8. サイトカインが、レセプターの少なくとも1つのサブユニットにチロシンキナーゼ、またはセリンもしくはスレオニンリン酸化またはキナーゼ活性を有するものである、請求項7記載のサイトカインの働きが低下した疾病の治療剤。

Fig.1

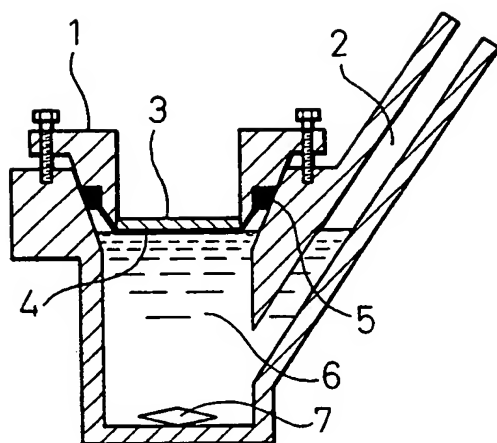
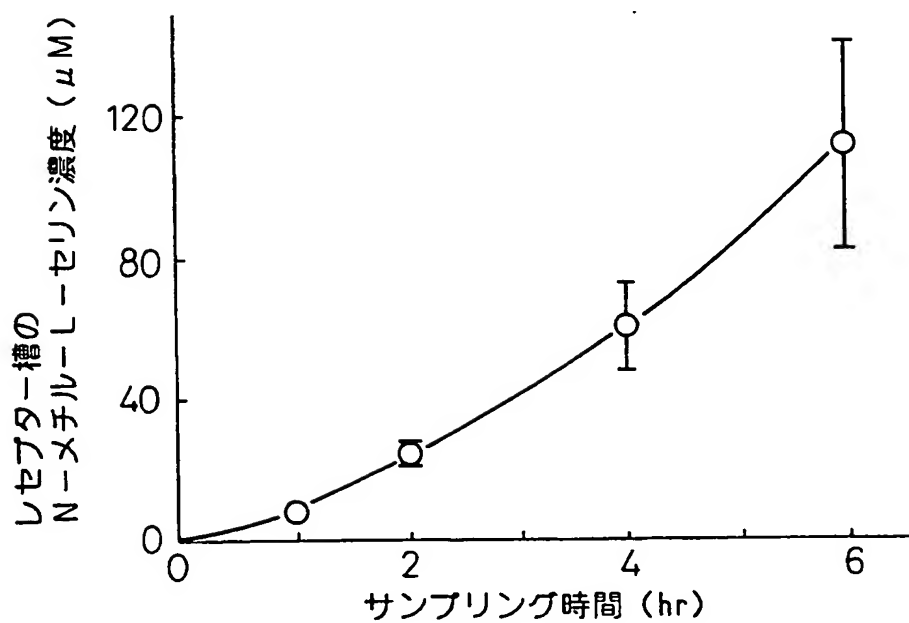


Fig.2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/00857

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁶ A61K31/13, A61K31/195, A61K37/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁶ A61K31/13, A61K31/195, A61K37/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| P | JP, 6-189780, A (Kanebo, Ltd.), July 12, 1994 (12. 07. 94) (Family: none) | 1 - 8 |
| A | JP, 63-57502, A (Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.), March 12, 1988 (12. 03. 88) (Family: none) | 1 - 8 |
| A | JP, 62-164631, A (Shionogi & Co., Ltd.), July 21, 1987 (21. 07. 87) & EP, 229016, A | 1 - 8 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

June 12, 1995 (12. 06. 95)

Date of mailing of the international search report

July 4, 1995 (04. 07. 95)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K31/13, A61K31/195, A61K37/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K31/13, A61K31/195, A61K37/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| P | JP, 6-189780, A (鐘紡株式会社), 12. 7月. 1994 (12. 07. 94) (ファミリーなし) | 1-8 |
| A | JP, 63-57502, A (藤沢薬品工業株式会社), 12. 3月. 1988 (12. 03. 88) (ファミリーなし) | 1-8 |
| A | JP, 62-164631, A (塩野義製薬株式会社), 21. 7月. 1987 (21. 07. 87) & EP, 229016, A | 1-8 |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日
若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
(理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日
の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と
矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため
に引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規
性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文
献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性
がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 06. 95

国際調査報告の発送日

04.07.95

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

松 浦 新 司

4 C 9 4 5 5

電話番号 03-3581-1101 内線 3453